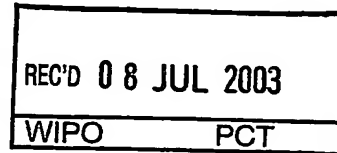


# BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 102 26 216.0

**Anmeldetag:** 13. Juni 2002

**Anmelder/Inhaber:** BAYER AKTIENGESELLSCHAFT,  
Leverkusen/DE

**Bezeichnung:** Behandlung von schweren Infektionen  
und septischem Schock

**IPC:** A 61 K 38/17

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 03. April 2003  
Deutsches Patent- und Markenamt  
Der Präsident

Im Auftrag

  
Faust

### **Behandlung von schweren Infektionen und septischem Schock**

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Rhesus-Theta-Defensin 1 (RTD-1) zur  
5 Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Patienten  
mit schweren Infektionen (Bakteriämien) inklusive septischem Schock.

Die Sepsis ist ein schweres, lebensbedrohendes Krankheitsbild resultierend aus einer  
10 Infektion mit Bakterien auf systemischer Ebene (Bakteriämie). Durchbricht nach  
einer lokalen Infektion der Erreger die körpereigenen Barrieren (z.B. Epithelien,  
Endothelien, Blut-Hirn-Schranke), so kann sich aus der daraus resultierenden  
Bakteriämie eine Sepsis entwickeln. Die Keime gelangen fortlaufend aus dem  
Sepsisherd (z.B. Abszess, Lunge, Magen-Darm-Trakt), der auch unerkannt bleiben  
15 kann, in die Blutbahn und damit in den gesamten Organismus. Die ins Blut und  
andere immunologische Organe gelangten Keime werden durch Abwehrfunktionen  
des Immunsystems zwar an ihrer Vermehrung gehindert, jedoch meistens nicht voll-  
ständig zerstört. Außerdem kommt es durch den Angriff auf die Keime durch das  
Immunsystem und auch durch Therapien mit bestimmten Antibiotika zur Freisetzung  
20 von bakteriellen Produkten wie Lipopolysaccharid, Lipoteichonsäure und ähnliche.

Eine Sepsis ist gekennzeichnet durch Fieber, Hypotonie und eine sogenannte Schock-  
symptomatik (z.B. Schocklunge, Schockniere, gastrointestinale Blutungen; im Allge-  
meinen als Multi-Organ-Versagen bezeichnet). Diese unterschiedlichen Symptome  
sind die klinischen Zeichen pathophysiologischer Vorgänge, die durch die Keime  
25 selbst oder ihre Produkte z.B. Endotoxine, Hämolysine oder Pyrogene bewirkt  
werden.

Die Freisetzung von bakteriellen Produkten oder die Bakterien selbst führen zu einer  
Reaktion des Organismus durch das Immunsystem. Die Patienteneigenen Faktoren  
30 des Immunsystems sind dabei sowohl protektiv als auch schädlich, abhängig von  
Konzentration, Wirkort und ähnlichem.

Prinzipiell können zwar nahezu alle Mikroorganismen eine Bakteriämie und damit nachfolgend eine Sepsis auslösen, jedoch hängt die prozentuale Verteilung der Keime vom Alter des Patienten, der Grunderkrankung, dem primären Infektionsherd und ähnlichem ab. Leitkeime sind sowohl gram-positive wie auch gram-negative Bakterien, sowie Pilze bzw. Hefen.

Therapieverfahren und Wirkstoffe, die die Freisetzung von derartigen Keimprodukten verhindern oder die derartige Produkte binden und neutralisieren oder die körpereigenen Funktionen und Faktoren beeinflussen oder zum Absterben der Keime führen, sind zur Behandlung von Symptomen der oben genannten Erkrankungen geeignet.

Substanzen und Verfahren, die zu einer Erniedrigung der Keimanzahl führen (z.B. Antibiotika) wie auch Substanzen mit kreislaufbeeinflussender Wirkung können therapeutisch genutzt werden (Forth, Henschler, Rummel; Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; Urban & Fischer Verlag (2001), München). Die Standardtherapie bei den oben beschriebenen Erkrankung sind Antibiotika zusammen mit kreislaufstabilisierenden und gerinnungsbeeinflussenden Substanzen oder Lösungen.

Ein weiterer Ansatz ist die Beeinflussung des Krankheitsbildes durch immunmodulatorische Behandlungen, um eine überschüssige Reaktion des Organismus auf Bakterien oder Bakterienprodukte zu verhindern oder zumindest abzumildern und damit ein Organversagen zu vermeiden.

Dabei sind auch lösliche Mediatoren des Immunsystems, die als Therapie zugeführt werden, von besonderem Interesse. Zu diesen Mediatoren gehören unter anderem auch die sogenannten Defensine, Moleküle mit anti-bakteriellen, anti-fungalen oder auch anti-viralen Eigenschaften. Zusätzlich besitzen diese Moleküle, die kleine

Peptide sind, modulatorische Eigenschaften auf das Immunsystem. Sie bewirken oder verhindern z.B. die Ausschüttung weiterer Mediatoren.

5 Ein Defensin aus Immunzellen des Rhesusaffen (Rhesus-Theta-Defensin 1; RTD-1) wurde isoliert und seine Eigenschaften, seine breite antibakterielle Wirkung, auch gegen nicht wachsende Bakterien, sowie seine antifungische Wirkung im Detail beschrieben (Tang et al. (1999), Science 286, 498-502; Tran et al. (2002), J. Biol. Chem. 277, 3079-3084) und auch zum Patent angemeldet (WO-00/68265). RTD-1 zeichnet sich durch einige charakteristische und bestimmende Eigenschaften gegen  
10 andere Defensine oder kationische Peptide aus. Zum einen ist RTD-1 ein kleines zirkuläres Peptid, und dadurch im Gegensatz zu anderen Defensinen stabil gegen Abbau und Degradation. RTD-1 zeigt keine Abhängigkeit der Wirkung von Salzen im Medium, und dadurch keinen Wirkverlust bei Anwesenheit physiologischer Konzentrationen von verschiedenen Salzen wie z.B. NaCl, KCl etc. (Muhle et al.  
15 (2001), Biochemistry 40, 5777-5785; Tang et al. (1999), Science 286, 498-502) und auch keinen Wirkverlust in Anwesenheit von humanem Serum (WO00/68265). Zusätzlich wurde kein hämolytische Wirkung festgestellt.

20 In der hier dargestellten Erfindung wird überraschend eine weitergehende Wirkung des RTD-1 in Zuständen der Bakteriämie mit nachfolgender Sepsis und septischem Schock, sowie derartige Krankheitszustände nach Exposition von bakteriellen Produkten wie zum Beispiel LPS gefunden.

25 Die vorliegende Erfindung betrifft daher die Verwendung von Theta-Defensin aus dem Rhesusaffen zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder der Prophylaxe von Bakteriämien und/oder Sepsis.

30 Dabei können die Krankheitsauslöser gram-positive Bakterien, gram-negative Bakterien, bakterielle Produkte oder Hefepilze sein.

Des weiteren betrifft die Erfindung die Verwendung von RTD-1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Bindung bakterieller Produkte wie LPS und/oder LTA.

5 Des weiteren können die genannten Anwendungen in Kombination mit Standard-Antibiotika oder Standard-Antimykotika erfolgen.

#### **Test auf anti-bakterielle Wirkung in-vitro**

10 Zur Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration werden Bakterien verschiedener Stämme abgestuften Konzentrationen von RTD-1 ausgesetzt, wobei eine 1:2 Verdünnungsreihe verwendet wird. Die Bestimmung erfolgt nach den Grundsätzen der NCCLS (siehe Dokumentation: Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria, NCCLS document M7-A5, Vol. 20 No. 2).

#### **Untersuchungen zur Bindung bakterieller Produkte**

15 Die Bindung von RTD-1 an Lipopolysaccharid (LPS) und Lipoteichonsäure (LTA) wird in einem Bindungsansatz in-vitro untersucht. Dabei wird Dansyl-Polymyxin B verwendet (Moore et al. (1986), Antimicrob. Agents Chemotherap. 29, 496-500), das nach Bindung an LPS oder LTA fluoresziert. In Konkurrenz mit RTD-1 ergibt sich eine Abnahme der Fluoreszenz und daraus resultierend eine Bestimmung der  
20 relativen Inhibition der Bindung von Dansyl-Polymyxin B.

Aus der Inhibition lässt sich wiederum eine relevante Affinität des RTD-1 bezüglich einer Bindung bakterieller Produkte berechnen.

25 Die Membranpermeabilität von Bakterien unter Einfluss von RTD-1 wird untersucht indem eine Fluoreszenzmethode angewandt wird (Silvestro et al. (2000), Antimicrob. Agents Chemotherap. 44, 602-607). Dies erlaubt eine Bewertung des Potentials des RTD-1 bezüglich Schädigungen der Zellmembran von Bakterien und damit auf die Freisetzung von bakteriellen Produkten.

Des weiteren wird der Einfluss von RTD-1 auf die Zellwandsynthese von Bakterien untersucht. Dabei wird RTD-1 zu einer Membranfraktion aus E.coli und den notwendigen Substraten gegeben und die inhibitorische Aktivität bestimmt (Chandrakala, B. *et al.* (2001) Antimicrob. Agents Chemother. 45, 768-775). Dieser Ansatz bestimmt den Einbau radioaktiver Vorstufen in hochmolekulares Peptidoglykan über Bindung an Weizenkeimagglutinin. Ein Einfluss von RTD-1 auf die Zellwandsynthese in Bakterien gibt wesentliche Aufschlüsse auf eine Wirkung auf das Bakterium (z.B. Lyse) und insbesondere im Zusammenhang mit der Freisetzung bakterieller Produkte, was eine wesentliche Voraussetzung für die Beurteilung des therapeutischen Potentials von RTD-1 in schweren Infektionen inklusive septischem Schock ist.

#### ***In vivo* Untersuchungen in krankheitsrelevanten Tiermodellen**

Bakteriensuspensionen werden in CFW-1 Mäuse intraperitoneal (i.p.) appliziert. Die Mäuse werden von Harlan bezogen. Nach 30 min. werden die Tiere dann intravenös (i.v.) mit RTD-1 in verschiedenen Dosen therapiert. Das Überleben der Tiere mit und ohne Therapie ergibt den Therapieerfolg.

Außerdem wird LPS in Mäuse i.p. injiziert und zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach der LPS-Gabe wird RTD-1 in verschiedener Dosierung i.v. appliziert, um einen septischen Schock zu simulieren. Das Überleben der Tiere ist das Mass für den Therapieerfolg im Modell für den septischen Schock.

### Formulierungen

RTD-1 kann in bekannter Weise in die üblichen Formulierungen überführt werden, wie Tabletten, Dragees, Pillen, Granulate, Aerosole, Sirupe, Emulsionen, Suspensionen und Lösungen, unter Verwendung inerter, nicht toxischer, pharmazeutisch geeigneter Trägerstoffe oder Lösungsmittel. Hierbei soll die therapeutisch wirksame Verbindung jeweils in einer Konzentration von 0,5 bis 90 Gew.-% der Gesamtmischung vorhanden sein, d.h. in Mengen, die ausreichend sind, um den angegebenen Dosierungsspielraum zu erreichen.

Die Formulierungen werden beispielsweise hergestellt durch Strecken der Wirkstoffe mit Lösungsmitteln und/oder Trägerstoffen, gegebenenfalls unter Verwendung von Emulgiermitteln und/oder Dispergiermitteln, wobei z.B. im Fall der Benutzung von Wasser als Verdünnungsmittel gegebenenfalls organische Lösungsmittel als Hilfs-  
lösungsmittel verwendet werden können.

Die Applikation erfolgt in üblicher Weise, vorzugsweise intravenös, transdermal, oral oder parenteral, insbesondere oral oder intravenös. Sie kann aber auch durch Inhalation über Mund oder Nase, beispielsweise mit Hilfe eines Sprays erfolgen, oder topisch über die Haut.

Im Allgemeinen hat es sich als vorteilhaft erwiesen, Mengen von etwa 0,001 bis 10 mg/kg, bei oraler Anwendung vorzugsweise etwa 0,005 bis 3 mg/kg Körpergewicht zum Erzielen wirksamer Ergebnisse zu verabreichen.

Trotzdem kann es gegebenenfalls erforderlich sein, von den genannten Mengen abzuweichen, und zwar in Abhängigkeit vom Körpergewicht bzw. der Art des Applikationsweges, vom individuellen Verhalten gegenüber dem Medikament, der Art von dessen Formulierung und dem Zeitpunkt bzw. Intervall, zu welchen die Verabreichung erfolgt. So kann es in einigen Fällen ausreichend sein, mit weniger als der vorgenannten Mindestmenge auszukommen, während in anderen Fällen die genannte obere Grenze überschritten werden muss. Im Falle der Applikation größerer Mengen

kann es empfehlenswert sein, diese in mehreren Einzelgaben über den Tag zu verteilen.



Beispiele:

5 Tabelle 1: Überleben von Mäusen nach i.p. Infektion mit *S. aureus* und Therapie mit 0.1, 1 und 10mg/kg RTD-1 i.v.. Die Mäuse werden mit  $1.68 \times 10^7$  Kolonien *S. aureus* ATCC Smith i.p. infiziert und nach 30 min mit den angegebenen Dosen i.v. therapiert. In der Tabelle sind die % Überlebenden aus  $n=6$  Mäusen an Tag 5 nach Infektion angegeben.

10 Tabelle 2: Überleben von Mäusen nach i.p. Infektion mit *S.pneumoniae* und Therapie mit 0.1, 1 und 10mg/kg RTD-1 i.v.. Die Mäuse werden mit  $3 \times 10^3$  Kolonien *S. pneumoniae* L3TV i.p. infiziert und nach 30 min mit den angegebenen Dosen i.v. therapiert. In der Tabelle sind die % Überlebenden aus  $n=6$  Mäusen an Tag 5 nach Infektion angegeben.

15 Tabelle 3: Überleben von Mäusen nach i.p. Infektion mit *E.coli* und Therapie mit 0.1, 1 und 10mg/kg RTD-1 i.v.. Die Mäuse werden mit  $1.68 \times 10^7$  Kolonien *E.coli* Neumann i.p. infiziert und nach 30 min mit den angegebenen Dosen i.v. therapiert. In der Tabelle sind die % Überlebenden aus  $n=6$  Mäusen an Tag 5 nach Infektion angegeben.

20 Tabelle 4: Überleben von Mäusen nach i.p. Applikation von 20mg/kg LPS von *S.typhimurium* (Sigma) und Therapie mit 0.1, 1 und 10mg/kg RTD-1 i.v. zu verschiedenen Zeitpunkten vor und nach LPS-Gabe. In der Tabelle sind die % Überlebenden aus  $n=5$  Mäusen an Tag 5 nach LPS-Gabe angegeben.

25  
30 Tabelle 5: Inhibition der Zellwandsynthese durch RTD-1, Ampicillin (Sigma), ein Lactam Antibiotikum, Chloramphenicol (Sigma), ein Proteinbiosynthesehemmer und Vancomycin (Sigma), ein Glycopeptid Antibiotikum. Dargestellt ist die Inhibition der Bindung an Weizenkeimagglutinin von radioaktiven Vorstufen in hochmolekulares Peptidoglykan. Nur Substanzen mit Einfluss auf die Zellwandbiosynthese, aber nicht Proteinbiosynthesehemmer zeigen eine Inhibition in diesem Ansatz.

Dosis	% Überleben
kein RTD-1 (Kontrolle)	17
0.1 mg/kg	67
1 mg/kg	83
10 mg/kg	83

Tabelle 1: Überleben von *S. aureus* infizierten Mäusen mit und ohne RTD-1 Therapie

5

Dosis	% Überleben
kein RTD-1 (Kontrolle)	17
0.1 mg/kg	50
1 mg/kg	67
10 mg/kg	33

Tabelle 2: Überleben von *S. pneumoniae* infizierten Mäusen mit und ohne RTD-1 Therapie

10

Dosis	% Überleben
kein RTD-1 (Kontrolle)	33
0.1 mg/kg	50
1 mg/kg	83
10 mg/kg	83

Tabelle 3: Überleben von *E.coli* infizierten Mäusen mit und ohne RTD-1 Therapie

15

Dosis	% Überleben				
	-2h	-1h	+0.1h	+1h	+2h
kein RTD-1 (Kontrolle)			0		
0.1 mg/kg	100	100	100	100	80
1 mg/kg	100	100	100	100	100
10 mg/kg	80	80	100	80	80

Tabelle 4: Überleben von LPS-behandelten Mäusen mit und ohne RTD-1 Therapie

Testsubstanz	50 % Inhibition bei $\mu\text{M}$
Ampicillin	8,8
Chloramphenicol	>100
Vancomycin	4,4
RTD1	7,2

Tabelle 5: Inhibition der Zellwandsynthese durch RTD-1, Ampicillin, Vancomycin und Chloramphenicol.

Literaturliste:

- Chandrakala, B. *et al.* (2001) Antimicrob. Agents Chemother. 45, 768-775
- Forth, Henschel, Rummel (2001), Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie; Urban&Fischer Verlag, München
- Moore *et al.* (1986), Antimicrob. Agents Chemotherap. 29, 496-500
- Muhle *et al.* (2001), Biochemistry 40, 5777-5785
- Silvestro *et al.* (2000), Antimicrob. Agents Chemotherap. 44, 602-607
- Tang *et al.* (1999), Science 286, 498-502
- Tran *et al.* (2002), J. Biol. Chem. 277, 3079-3084

**Abkürzungsliste:**

ATCC	American Type Culture Collection
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichonsäure
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
RTD	Rhesus Theta Defensin

**Patentansprüche**

1. Verwendung von RTD-1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Bakteriämien.
2. Verwendung gemäss Anspruch 1, wobei die Krankheitsauslöser gram-positive Bakterien, gram-negative Bakterien, bakterielle Produkte oder Hefepilze sind.
3. Verwendung von RTD-1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Bindung bakterieller Produkte wie LPS und/oder LTA.
4. Verwendung von RTD-1 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder der Prophylaxe des septischen Schocks.
5. Verwendung gemäss Anspruch 4, wobei die Krankheitsauslöser gram-positive Bakterien, gram-negative Bakterien, bakterielle Produkte oder Hefepilze sind.
6. Verwendung gemäss Anspruch 1 in Kombination mit Standard-Antibiotika.
7. Verwendung gemäss Anspruch 1 in Kombination mit Standard-Antimykotika.
8. Verwendung gemäss Anspruch 4 in Kombination mit Standard-Antibiotika.
9. Verwendung gemäss Anspruch 4 in Kombination mit Standard-Antimykotika.
10. Verfahren zur Herstellung eines Arzneimittels enthaltend RTD-1 sowie pharmazeutische Hilfsmittel.

**Behandlung von schweren Infektionen und septischem Schock**

**Z u s a m m e n f a s s u n g**

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Rhesus-Theta-Defensin 1 (RTD-1) zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Patienten mit schweren Infektionen (Bakteriämien) inklusive septischem Schock.

SEQUENCE LISTING

5        <110>   Bayer AG

         Spaltmann, Frank

10

<120>   Behandlung von schweren Infektionen und septischem Schock

15

<130>   Le A 36 086

<160>   1

20

<170>   PatentIn version 3.1

25

<210>   1

<211>   18

30

Le A 36 086

<212> PRT

<213> Rhesusaffe

5

<400> 1

Gly Phe Cys Arg Cys Leu Cys Arg Arg Gly Val Cys Arg Cys Ile Cys

10

1

5

10

15

Thr Arg

15